

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 11 December 2000 (11.12.00)	
International application No. PCT/DE00/00927	Applicant's or agent's file reference PCT/Bioserv 10
International filing date (day/month/year) 23 March 2000 (23.03.00)	Priority date (day/month/year) 26 March 1999 (26.03.99)
Applicant HEINRICH, Hans-Werner et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
 19 October 2000 (19.10.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Maria Kirchner
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts PCT/Bioserv 10	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 00/00927	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 23/03/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 26/03/1999
Anmelder BIOSERV AG et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. ---

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

TECH CENTER 1607/900

FEB 12 2001

RECEIVED

91933

Applicant's or agent's file reference PCT/Bioserv 10	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/DE00/00927	International filing date (day/month/year) 23 March 2000 (23.03.00)	Priority date (day/month/year) 26 March 1999 (26.03.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC B01J 20/22		
Applicant BIOSERV AG		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

I ☒ Basis of the report

II ☐ Priority

III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

IV ☐ Lack of unity of invention

V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

VI ☐ Certain documents cited

VII ☒ Certain defects in the international application

VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 19 October 2000 (19.10.00)	Date of completion of this report 15 May 2001 (15.05.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE00/00927

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages 1-11, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
 pages 1-17, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages 1-7, filed with the letter of 11 August 2000 (11.08.2000)

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (103570)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 00/00927

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-17	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-17	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-17	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The document EP-A-0 300 740 discloses an immunoabsorbent for the removal of complement factor C5a to purify the blood, where monoclonal antibodies coupled to polystyrene are used (see Claims 1-6).

The immunoabsorbent defined in Claim 1 differs from this prior art in that antibodies directed against lipopolysaccharides (LPS) are additionally coupled to the support, this immunoabsorbent being suitable for the treatment of sepsis.

US-A-5 679 775 discloses the removal of LPS from blood for the treatment of sepsis by means of cation or anion exchangers (see Claim 1). The use of LPS-specific antibodies is not, however, advised (see column 2, lines 28-34).

The combined use of antibodies directed against complement factors C3a and/or C5a and antibodies directed against LPS in accordance with the present Claims 1, 14 and 16, and in accordance with dependent Claims 2-13, 15 and 17, is therefore neither described in nor obvious from the searched prior art. It therefore satisfies the

THIS PROJECT (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 00/00927

requirements of PCT Article 33(2) and (3).

THIS IS A COPY

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 00/00927

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not cite the documents EP-A-0 300 740 and US-A-5 679 775 or indicate the relevant prior art disclosed therein.

THIS PAGE BLANK (3/1/77)

5000
09/937126
VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESENS

REC'D 17 MAY 2001

WIPO

PCT

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT



(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts PCT/Bioserv 10	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/00927	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 23/03/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 26/03/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK B01J20/22		
Anmelder BIOSERV AG et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 19/10/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 15.05.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Linker, W Tel. Nr. +49 89 2399 8703 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-11 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-17 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

1-7, eingereicht mit Schreiben vom 11.08.00.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:

THIS PAGE BLANK

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/00927

☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-17
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-17
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-17
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPIO)

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

In dem Dokument EP-A-0 300 740 wird ein Immunadsorber zur Entfernung von Komplementfaktor C5a zur Blutreinigung beschrieben, bei dem monoklonale Antikörper an Polystyrol gebunden eingesetzt werden (siehe Ansprüche 1-6).

Von diesem Stand der Technik unterscheidet sich der Immunadsorber nach Anspruch 1 dadurch, daß zusätzlich Antikörper gegen Lipopolysaccharide (LPS) an den Träger gebunden sind, wobei dieser Immunadsorber zur Sepsistherapie geeignet ist.

Aus US-A-5 679 775 ist bekannt LPS aus Blut zur Sepsistherapie mittel Kationen- oder Anionenaustauschern zu entfernen (siehe Anspruch 1), von der Verwendung von LPS spezifischen Antikörpern wird jedoch abgeraten (siehe Spalte 2, Zeile 28-34).

Die kombinierte Anwendung von Antikörpern gegen Komplementfaktoren C3a und/oder C5a mit Antikörpern gegen LPS gemäß der vorliegenden Ansprüche 1, 14 und 16, sowie der abhängigen Ansprüche 2-13, 15 und 17 wird daher im ermittelten Stand der Technik weder beschrieben noch nahegelegt und erfüllt daher die Erfordernisse der Artikel 33(2) und (3) PCT.

Zu Punkt VII

Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in den Dokumenten EP-A-0 300 740 und US-A-5 679 775 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch diese Dokumente angegeben.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K39/44 B01J20/22 A61M1/36 C07K1/22 //C07K16/02,
C07K16/18, C07K16/24

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K A61M C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

CHEM ABS Data, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 94 21124 A (APPLIED IMMUNESCIENCES) 29. September 1994 (1994-09-29) Seite 1, Zeile 10 -Seite 3, Zeile 21 Seite 5, Zeile 18 -Seite 6, Zeile 24 Seite 9, Zeile 5 -Seite 10, Zeile 2; Tabellen 1,2	1-17
Y	HOFFMANN J.N. ET AL: "Effect of hemofiltration on hemodynamics and systemic concentrations of anaphylatoxins and cytokines in human sepsis." INTENSIVE CARE MEDICINE, (1996) 22/12 (1360-1367). , XP000939172 Seite 89 Seite 94, Zeile 1 -Seite 96, letzte Zeile	1-17

	-/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

15. September 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

26/09/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Muller-Thomalla, K

THIS PAGE BLANK (US)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 300 740 A (CEFEM AS) 25. Januar 1989 (1989-01-25) Seite 2, Zeile 13-38 Seite 6, Zeile 3-10; Ansprüche 2-7 -----	1-17
Y	US 5 679 775 A (BOOS KARL-SIEGFRIED ET AL) 21. Oktober 1997 (1997-10-21) Spalte 1, Zeile 9 -Spalte 2, Zeile 10 Spalte 3, Zeile 8 - Zeile 52 -----	1-17
Y	GB 2 251 187 A (CELLTECH LTD) 1. Juli 1992 (1992-07-01) Seite 2, Absatz 3 -Seite 6, Absatz 2; Ansprüche 1-3 -----	1-17

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATION SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/DE 00/00927

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K39/44 B01J20/22 A61M1/36 C07K1/22 //C07K16/02,
C07K16/18,C07K16/24

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K A61M C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 94 21124 A (APPLIED IMMUNESCIENCES) 29 September 1994 (1994-09-29) page 1, line 10 -page 3, line 21 page 5, line 18 -page 6, line 24 page 9, line 5 -page 10, line 2; tables 1,2	1-17
Y	HOFFMANN J.N. ET AL: "Effect of hemofiltration on hemodynamics and systemic concentrations of anaphylatoxins and cytokines in human sepsis." INTENSIVE CARE MEDICINE, (1996) 22/12 (1360-1367). XP000939172 page 89 page 94, line 1 -page 96, last line -/--	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 September 2000

Date of mailing of the international search report

26/09/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Muller-Thomalla, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/00927

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 300 740 A (CEFEM AS) 25 January 1989 (1989-01-25) page 2, line 13-38 page 6, line 3-10; claims 2-7	1-17
Y	US 5 679 775 A (BOOS KARL-SIEGFRIED ET AL) 21 October 1997 (1997-10-21) column 1, line 9 -column 2, line 10 column 3, line 8 - line 52	1-17
Y	GB 2 251 187 A (CELLTECH LTD) 1 July 1992 (1992-07-01) page 2, paragraph 3 -page 6, paragraph 2; claims 1-3	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/00927

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9421124	A	29-09-1994	US 5437861 A	01-08-1995
			AU 680897 B	14-08-1997
			AU 6517694 A	11-10-1994
			CA 2156721 A	29-09-1994
			EP 0689380 A	03-01-1996
			JP 9501066 T	04-02-1997
			SG 49338 A	18-05-1998
			US 5523096 A	04-06-1996
			US 5730713 A	24-03-1998
EP 0300740	A	25-01-1989	NO 873017 A	23-01-1989
			DK 402888 A	21-01-1989
			FI 883424 A	21-01-1989
US 5679775	A	21-10-1997	DE 19515554 A	31-10-1996
			DE 19549420 A	18-09-1997
			EP 0739630 A	30-10-1996
			JP 2804920 B	30-09-1998
			JP 8299436 A	19-11-1996
GB 2251187	A	01-07-1992	AT 119043 T	15-03-1995
			AU 651320 B	21-07-1994
			AU 6350090 A	11-03-1991
			AU 7590694 A	27-01-1995
			DE 69017455 D	06-04-1995
			DE 69017455 T	29-06-1995
			DK 486609 T	08-05-1995
			EP 0486609 A	27-05-1992
			ES 2071827 T	01-07-1995
			WO 9101755 A	21-02-1991
			ZA 9006345 A	29-04-1992

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7 : B01J 20/22, A61M 1/36, C07K 1/22, A61P 31/00 // C07K 16/02, 16/18, 16/24		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/58005
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 5. Oktober 2000 (05.10.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/00927		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 23. März 2000 (23.03.00)			
(30) Prioritätsdaten: 199 13 707.2 26. März 1999 (26.03.99) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOSERV AG [DE/DE]; Dr.-Lorenz-Weg 1, D-18059 Rostock (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HEINRICH, Hans-Werner [DE/DE]; Hauptstrasse 4, D-17498 Riemserort (DE). HAHN, Hans-Jürgen [DE/DE]; Nepziner Weg 14 m, D-17495 Karlsburg (DE). MEYER, Udo [DE/DE]; Mitteldorfstrasse 4, D-18239 Hastorf (DE). KR-USCHKE, Peter [DE/DE]; Boddenblick 2, D-17498 Insel Riems (DE). WAGNER, Heinz-Jürgen [DE/DE]; Walter-Friedrich-Strasse 3, D-13125 Berlin (DE).		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).			
(54) Title: IMMUNOADSORBER FOR USE IN SEPSIS THERAPY			
(54) Bezeichnung: IMMUNADSORBER ZUR SEPSISTHERAPIE			
(57) Abstract <p>The invention relates to an immunoabsorber for use in sepsis therapy, especially for removing complement factors and lipopolysaccharides (LPS) and optionally other sepsis mediators such as TNF and interleukins from body fluids. The invention also relates to a method for producing said immunoadsorbers and to their use.</p>			
(57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft Immunadsorber zur Sepsistherapie, insbesondere zur Entfernung von Komplementfaktoren und Lipopolysacchariden (LPS) sowie ggf. von weiteren Sepsis-Mediatoren, wie z.B. TNF und Interleukinen aus Körperflüssigkeiten. Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Immunadsorber zur Sepsistherapie

Die Erfindung betrifft Immunadsorber zur Sepsistherapie, insbesondere zur Entfernung von Komplementfaktoren und Lipopolysacchariden (LPS) sowie ggf. von TNF und Interleukinen aus Körperflüssigkeiten, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung.

Jährlich erkranken in den USA, Japan und der EU ca. 3.5 Mill. Patienten an Sepsis. Bei einer Gesamteinwohnerzahl von 785 Mill. liegt die Inzidenz für diese Länder unter 0,5%. Wenn jedoch hospitalisierte Patienten hinsichtlich der Erkrankungshäufigkeit untersucht werden, findet man $2,0 \pm 0,16$ Sepsisfälle pro 100 Krankenhausaufnahmen. Die enorme gesundheitspolitische und individuelle Bedeutung ergibt sich aus der Beobachtung, daß ca. 25 % dieser Patienten auch bei intensivster medizinischer Betreuung durch hochqualifizierte Spezialisten in modern ausgestatteten Einrichtungen (Intensivstationen) das Syndrom des septischen Schocks erleiden, das durch eine Letalitätsrate von >45% charakterisiert ist.

Insbesondere bei polytraumatisierten Patienten (Verkehrsunfälle, Verbrennung, schwere Operationen) ist das Erkrankungsrisiko für den septischen Schock sehr hoch. Neben der Infektion von außen ist das Durchbrechen der Darmbarriere für normalerweise im Darm vorkommende gram-negative Bakterien infolge eines partiellen Funktionsverlustes des Immunsystems dieser Patienten und somit eine Infektion von „innen“ nachzuweisen.

In mehr als 50% der Erkrankungen lösen gram-negative Bakterien bzw. deren Zellwandbestandteile, die Endotoxine (Lipopolysaccharide, LPS), den septischen Schock aus. Das von den Bakterien freigesetzte LPS bindet sich an ein Serumprotein (LBP), um danach von den LPS-Rezeptoren der Monocyten/Makrophagen (CD14) aufgenommen zu werden. Die so aktivierten CD14+ Zellen produzieren Zytokine ($\text{TNF}\alpha$, Interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-8), die via Zytokin-Rezeptor der Zielzelle ihre Wirkung ausüben.

Parallel zur Stimulierung der Monozyten und Makrophagen wird das Komplementsystem aktiviert. Es ist ein integrierter Bestandteil der immunologischen Abwehr der Säugetiere zur unmittelbaren und unspezifischen Bekämpfung bakterieller Mikroorganismen und Fremdpartikel. Von den im Blutserum vorkommenden Komplement-

proteinen, vorrangig Proenzyme, die durch proteolytische Spaltung aktiviert werden, spielt das C3-Protein mit einer Serumkonzentration von ca. 1g/l eine zentrale Rolle. Nach Kontakt der Mikroorganismen mit dem C3 wird das Komplementprotein C3a abgespalten und durch das entstehende C3b wird einerseits die Bildung der C5-Konvertase eingeleitet (alternativer Weg der Komplementaktivierung) und andererseits die Reaktion dadurch amplifiziert, indem das C3b durch Anlagerung von Serumfaktoren sich zur C3-Konvertase wandelt. Das ebenfalls im Serum vorkommende Komplementprotein C5 wird durch die nun verstärkt bereitgestellte C5-Konvertase proteolytisch unter Bildung von C5a gespalten. An das entstandene C5b lagern sich weitere Komplementproteine (C6-C9) an, bis schlußendlich der polymere hydrophobe Membranangriffskomplex (MAK) gebildet wurde, der sich in die Bakterienmembran (Opsonidierung) einlagert und Poren bildet, die zur Phagozytose und damit zur Elimination der Mikroorganismen (und des gebundenen MAK) führen. Die im Prozeß der Komplementaktivierung freigesetzten Komplementfaktoren C3a und C5a (Anaphylatoxine) bewirken durch eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität und die durch sie induzierte Freisetzung von Chemotoxinen das Anlocken der phagozytierenden Zellen an den Ort des bakteriellen Befalls. Die Verringerung der Anzahl an Bakterien bewirkt die Verminderung der Aktivierung des Komplementsystems. Diese unmittelbare und unspezifische Reaktion ist mit den anderen immunologischen Abwehrsystemen insofern eng verwoben, als daß beispielsweise durch Komplementfaktoren die Synthese und Freisetzung der für die zelluläre Abwehr essentiellen Zytokine reguliert wird. Um die inflammatorische Wirkung zu vermitteln, werden C3a und C5a an spezifische zellständige Rezeptoren gebunden, die wiederum in Abhängigkeit von der Immunreaktivität unterschiedlich stark exprimiert werden. Um die Immunabwehr permanent reaktionsbereit zu erhalten, sind aktivierte Komplementfaktoren nicht nur nach Befall mit Mikroorganismen nachweisbar, sondern integrierter Bestandteil des Serums von Normalpersonen in einer Konzentration von 1 - 10 ng/ml.

Insbesondere bei einer entwickelten Sepsis, bei akutem Lungenversagen und bei moribunden Patienten können die Plasmaspiegel der Anaphylatoxine mehr als tausendfach erhöht sein.

Fast ausschließlich auf der Basis von in vitro-Untersuchungen existieren unterschiedlichste, meistens unspezifisch wirkende Lösungsvarianten, um die Wirkungen verschiedener Komplementfaktoren zu eliminieren, die aber wegen der zu erwartenden Nebenwirkungen kaum unter in vivo Bedingungen getestet werden können (z.B. WO-A-98/34959).

In ex vivo Verfahren zur Prävention der Komplementaktivierung durch künstliche, extrakorporale Oberflächen (z.B. Oberflächenbeschichtungen) wurde eine unspezifische Komplementinaktivierung erfolgreich durchgeführt. Des weiteren ist aus US 5,853,722 die selektive Entfernung aktivierter Komplementfaktoren unter Nutzung von spezifischen C5 Antikörpern bekannt und sicher auch zu bevorzugen, zumal hochaffine Antikörper zwischenzeitlich gegen alle Komponenten des Komplementsystems generiert wurden.

Die aufgezeigte funktionelle Kaskade dient vornehmlich der Eliminierung der in den Organismus eingedrungenen Bakterien. Sobald jedoch eine Diskrepanz zwischen der Anzahl und/oder Virulenz der eingedrungenen Bakterien und der Eliminierungskapazität des Immunsystems (z.B. beim posttraumatischen Immundefizit) auftritt, wird eine überschießende Aktivierung beobachtet, die nachfolgend von einer massenhaften Freisetzung von „Schockmediatoren“ (Interleukine, Thrombozytenaktivierungsfaktor (PAF), aber auch Sauerstoffradikale, Prostaglandine und deren Stoffwechselprodukte) begleitet wird, die die Eliminierungskapazität für LPS weiter einschränkt. Zusätzlich werden durch das LPS auch CD14-negative Zellen (z.B. Endothelien) aktiviert, da im Blutplasma lösliches CD14 (sCD14) als LPS Fänger vorhanden ist, das die Bindung an diese Zellen erleichtert und die Bildung und Freisetzung weiterer Schockmediatoren induziert, die dadurch den Circulus vitiosus verstärken. Da die Schockmediatoren zwar selektiv, aber nicht spezifisch wirken, werden Funktionseinschränkungen in verschiedenen Zellen und Organen beobachtet (Blutgerinnungssystem, Kreislauf, Komplement-System), so daß die den gesamten Organismus befallenden Entzündungsreaktionen die Schockgenese einleiten, die zu irreversiblen Organschäden, zum Kreislaufzusammenbruch und zum Tod führen.

Um diese Funktionskette zu durchbrechen sind unterschiedliche Therapiestrategien untersucht worden.

Die Unterbrechung der Kaskade mit Antikörpern, die die LPS-Bindung an Proteine (LBP, sCD14), an den Rezeptor (CD14), an freigesetzte Zytokine oder an Zytokinrezeptoren unterbrechen bzw. mit Antagonisten, welche die funktionellen Bereiche der Rezeptoren blockieren, erbrachten an verschiedenen tierexperimentellen Sepsismodellen zwar beeindruckende Erfolge, jedoch bis heute liegen keine klinisch erprobten, erfolgreichen Präventions- und/oder Therapiestudien vor.

Die hochgesteckten Erwartungen konnten nicht erfüllt werden, da zunehmend erkannt werden mußte, daß LPS auch Zellen und Gewebe beeinflusst und in ihrem Funktionszustand verändert, die durch diese Therapieansätze nicht beeinträchtigt werden. Außerdem muß berücksichtigt werden, daß ein durch einen Antikör-

per/Antagonisten inaktiviertes LPS (Immunkomplex) eliminiert werden muß, um eine biologische Reaktivität permanent auszuschließen. Die Eliminierung ist aber auch eine Funktion des Immunsystems, das, da stark geschwächt, dieser Aufgabe kaum oder nur sehr unvollkommen nachkommen kann.

Die Entwicklung des septischen Schocks ist ein sehr dynamisches Geschehen primär unterschiedlicher Genese, bei dem innerhalb kurzer Zeit unterschiedliche Mediatoren sehr verschiedene Reaktionen bewirken, die nach anfänglich lebenserhaltender Funktion rasch durch Fehlregulation zur Ausprägung des septischen Schocks führen.

Der Erfindung lag deshalb die Aufgabe zugrunde, ein modular aufgebautes Immunadsorptionssystem insbesondere für die extrakorporale Detoxifikation zu entwickeln, das es ermöglicht, patientenspezifisch Plasma- und Gewebespiegel zu reduzieren.

Die Erfindung beruht unter anderem auf der Erkenntnis, daß $\text{TNF}\alpha$ eine Schlüsselstellung in diesem Regulationssystem einnimmt. Es wird durch unterschiedlichste „äußere“ Einflüsse, wie z.B. Verletzungen, Entzündungen, Infektionen, Septikämie u.a. von Makrophagen freigesetzt und induziert über eine Zytokinkaskade (IL-1, IL-6) eine lokale und systemische Aktivierung des unspezifischen und spezifischen Abwehrsystems. Klinisch äußert sich eine massive $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung in erhöhter Körpertemperatur, Inappetenz und allen Folgesymptomen einer katabolischen Stoffwechsellage. In der Pathogenese der Sepsis scheint in der frühen Phase dieser Erkrankung die Aktivierung der Makrophagen und damit die $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung für das Überleben des Patienten von essentieller Bedeutung zu sein, während im weiteren Verlauf der anhaltende Aktivierungszustand die Dekompensation aller Abwehrreaktionen nach sich zieht.

Die Aufgabe der Erfindung wurde durch einen Immunadsorber zur Sepsistherapie gelöst. Insbesondere dient der erfindungsgemäße Immunadsorber zur Entfernung von Komplementfaktoren und Lipopolysacchariden (LPS) sowie ggf. zur Entfernung von weiteren Sepsis-Mediatoren, wie von TNF und Interleukinen aus Körperflüssigkeiten. Er ist gekennzeichnet durch Trägermaterialien aus organischen oder synthetischen Polymeren, an die sowohl poly- oder monoklonale Antikörper gebunden sind, die gegen die Komplementfaktoren C3a und/oder C5a gerichtet sind, als auch Antikörper, die gegen Lipopolysaccharide (LPS) gerichtet sind. In einer bevorzugten Ausführung sind auch Antikörper, die gegen weitere Sepsis-Mediatoren gerichtet sind, an die Träger gebunden.

Bevorzugt handelt es sich um polyklonale Antikörper besonders bevorzugt um aviäre Antikörper des Typs IgY. Die Antikörper gegen Sepsis-Mediatoren sind entsprechend des Zustandes der Dysregulation enthalten.

Gemäß der Erfindung handelt es sich dabei um Antikörper, die gegen TNF, IL1, IL6, IL8 und/oder IL10 gerichtet sind.

Bevorzugte Antikörper gegen den Komplementfaktor C3a weisen spezifische Aktivität gegen mindestens eine der folgenden Peptidsequenzen auf:

NH₂-KCCEDGMRQNPMR-COOH

NH₂-RFSCQRRTRFISL-COOH

NH₂-ITELRRQHARAS-COOH

Bevorzugte Antikörper gegen den Komplementfaktor C5a besitzen spezifische Aktivität gegen mindestens eine der folgenden Peptidsequenzen:

NH₂-QADYKDDDDKLPAE-COOH

NH₂-DDKLPAEGLDIENS-COOH

Bevorzugte Antikörper gegen IL1 α/β besitzen spezifische Aktivität gegen mindestens eine der folgende Peptidsequenzen

NH₂-NCYSENEEDSSSID-COOH

NH₂-GAYKSSKDDAKIT-COOH

NH₂-WETHGTKNYFTS-COOH

NH₂-RISDHHYSKGFRQA-COOH

NH₂-VQGEESNDKIPVA-COOH

NH₂-ESVDPKNYPKKKMEKRF-COOH

Bevorzugte Antikörper gegen IL6 besitzen spezifische Aktivität gegen mindestens eine der folgende Peptidsequenzen

NH₂-APHRQPLTSSERIDKQI- COOH

NH₂-QNRFESSEEQARA- COOH

NH₂-AITTPDPTTNAS- COOH

Bevorzugte Antikörper gegen IL10 besitzen spezifische Aktivität gegen mindestens eine der folgende Peptidsequenzen

NH₂-SPGQGTQSENSCT-COOH
NH₂-QMKDQLDNLLLKES-CCOH
NH₂-MPQAENQDPDIKA-COOH
NH₂-LPCENKSKAVEQ-COOH

Bevorzugte Antikörper gegen TNF α besitzen spezifische Aktivität gegen mindestens eine der folgende Peptidsequenzen

NH₂-VRSSSRTPSDKPVA-COOH
NH₂-KSPCQRETPEGAEAKPW-COOH

Der erfindungsgemäße Immunadsorber weist als Trägermaterialien an sich übliche Membranen oder Partikel aus organischen oder synthetischen Polymeren auf, so z.B. aus Polystyrolen, Kohlenhydraten, wie z.B. Zellulose- oder Agarosederivate, oder aus Acrylaten, wobei die spezifischen Antikörper kovalent an diese gebunden oder über Spacer oder Linker an sie fixiert sind.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Immunadsorber erfolgt durch an sich bekannte Methoden, indem die Antikörper, die gegen C3a und/oder C5a und LPS sowie ggf. gegen weitere Sepsis-Mediatoren gerichtet sind, kovalent oder adsorptiv an die Trägermaterialien aus organischen oder synthetischen Polymeren gekoppelt werden.

Die spezifischen Antikörper werden durch an sich bekannte Immunisierung vorzugsweise von Kleinsäugetieren, wie Mäusen, Ratten oder Kaninchen oder Vögeln, wie z.B. Hühnern, mit den entsprechenden Antigenen hergestellt.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung der Immunadsorber in Vorrichtungen zur Entfernung von Komplementfaktoren, LPS und ggf. von weiteren Mediatoren aus Körperflüssigkeiten, wie Blutplasma, in Abhängigkeit der patientenspezifischen Situation.

Bevorzugt werden die Immunadsorber in der Sepsistherapie für die Plasmapherese bei Patienten mit Sepsis oder septischem Schock eingesetzt.

Obwohl für die meisten Substanzen Antikörper verfügbar sind, die nach bekannten Methoden an die unterschiedlichen Träger gekoppelt werden können, werden bevorzugt aviäre Antikörper verwendet, da diese im Gegensatz zu Säuger-Antikörpern das Komplementsystem nicht aktivieren. Da die aktivierenden Eigenschaften an den F_c-Teil der Säuger-Antikörper gebunden sind, kann prinzipiell auch das mit Papan abgespaltene F_{ab}-Fragment verwendet werden.

Nach derzeitigem Kenntnisstand haben immobilisierte aviäre Antikörper keinerlei unspezifische Wirkungen auf das Abwehrsystem des Menschen. Vögel, vorzugsweise Hühner werden mit üblichen Verfahren ohne oder mit Verwendung von Adjuvantien immunisiert. Die spezifischen Immunglobuline werden im Eidotter ausgeschieden und können hieraus mit üblichen Methoden isoliert werden. Sie werden mit bekannten Verfahren kovalent über den Fc-Teil an Mikropartikel oder Membranen gebunden.

Mit dem erfindungsgemäßen Immunadsorptionssystem für die extrakorporale Detoxifikation steht erstmals ein selektives System zur Verfügung, welches patientenspezifisch einsetzbar ist und durch das Fehlregulationen des Immunsystems behoben werden können.

Die Erfindung wird durch folgende Beispiele näher erläutert:

Beispiel 1

Herstellung polyklonaler Antikörper mittels immunogener Peptide:

Mittels einer Festphasensynthese werden die in Tab. 1 aufgelisteten Peptide hergestellt:

Tabelle 1

Peptidsequenz	Antigen
KCCEDGMRQNPMR	C3a
RFSCQRRTRFISL	
ITELRRQHARAS	
QADYKDDDDKLPAE	C5a
DDKLPAEGLDIENS	
SPGQGTQSENSCT	IL10
QMKDQLDNLLLKES	
MPQAENQDPDIKA	
LPCENKSKAVEQ	
NCYSENEEDSSSID	IL1 α
GAYKSSKDDAKIT	
WETHGTKNYFTS	
RISDHHYSKGFRQA	IL1 β
VQGEESNDKIPVA	
ESVDPKNYPKKKMEKRF	
APHRQPLTSSERIDKQI	IL6
QNRFESSEEQARA	
AITTPDPTTNAS	
VRSSSRTPSDKPVA	TNF α
KSPCQRETPEGAEAKPW	

Diese Peptide werden nach Standardrezeptur kovalent an einen Träger (KLH) gebunden. Das Konjugat wird in PBS gelöst zu gleichen Teilen mit Freund's-Adjuvans gemischt. Die einzelne Impfdosis wird so eingestellt, dass sie jeweils 200 μ g des

zum entsprechenden Antigen gehörenden Peptids enthält. Mit diesen Gemischen werden 15 Wochen alte Junghennen s.c. immunisiert und im Abstand von 4 Wochen 4 mal geboostert.

Beispiel 2

Herstellung polyklonaler Antikörper mittels Lipopolysacchariden (LPS)

Gereinigte LPS (SIGMA) von E. coli J5 werden in PBS gelöst und zu gleichen Teilen mit Freund's-Adjuvans gemischt. Mit diesem Gemisch werden 15 Wochen alte Junghennen s.c. immunisiert. Die LPS-Dosis beträgt pro Immunisierung 1 mg LPS. Im Abstand von 4 Wochen wird 4 mal geboostert.

Beispiel 3

Gewinnung der Antikörper (IgY) aus Eidotter:

Die Eier aus den Gelegen der immunisierten Hennen werden gesammelt. Nach Separation der antikörperhaltigen Eidotter erfolgt die Lagerung bei -20°C . Entsprechend dem Bedarf werden die Dotter aufgetaut und nach folgendem Schema aufbereitet (C.SCHWARZKOPF, B.THIELE (1996) ALTEX 13 Suppl. 16, 35-3):

- A TBS: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 0,5 M NaCl
- B 10 % (w/v) Dextransulfat in A
- C 1 M CaCl_2
- D 0,5 M EDTA, pH 7,5
- E gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung

Lösungen

Das Eigelb (entspricht einem Volumen von 10 - 20 ml/Eigelb) wird in 100 ml TBS je Eigelb suspendiert. Lipide und Lipoproteine werden mit Dextransulfat (6 ml B je 100 ml TBS/Eigelb-Suspension) und Ca^{++} (15 ml C je 100 ml TBS-Eigelb-Suspension) gefällt, 30 bis 60 Min. bei Raumtemperatur gerührt und mit 5.000 g abzentrifugiert. Das Pellet wird mit einem kleinen Volumen TBS (ca. 20 mlg/Eigelb) gewaschen und wieder zentrifugiert.

Die vereinigten Überstände werden durch ein Papierfilter filtriert, dann wird zum Filtrat 0,5 M EDTA bis zu einer Endkonzentration von ca. 30 mM EDTA (6 ml je 100 ml) gegeben, um restliche Ca^{++} -Ionen zubinden. Anschließend wird der Überstand mit 24,3 g Ammoniumsulfat je 100 ml (entspricht 40% Sättigung) versetzt und 30 min. bei $+4^\circ \text{C}$ inkubiert. Der entstandene Niederschlag (IgY) wird zuerst mit 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (30 ml E + 70 ml dest. Wasser) gewaschen, zentrifugiert, dann im kleinstmöglichen Volumen TBS gelöst (ca. 10 ml / eingesetztes Eigelb) und gegen TBS dialysiert.

Der Gehalt an IgY wird photometrisch bei 275 nm bestimmt.

Beispiel 4

a) Aktivierung eines Trägers:

Die nach Beispiel 3 gereinigten IgY werden kovalent an einen geeigneten Träger gebunden. Dazu kann z.B. Sepharose wie nachstehend beschrieben, aktiviert werden (H.-F.Boeden, W.Büttner, C.Rupprich, D.Büttner, S.Heinrich, M.Becker, M.Holtzhauer (1992) Makromol. Chem. **193**, 865-887):

Der Agarose-Träger wird stufenweise, d.h. durch eine um 20 % schrittweise sich erhöhende Menge an Aceton überführt. Zum Schluß wird der Träger in einem fünffachen Bettvolumen mit wasserfreiem Aceton in einem verschlossenen Gefäß über Nacht stehen gelassen und nochmals mit 5 bis 10 Vol. wasserfreiem Aceton gewaschen und kurz auf einer G2-Fritte abgesaugt. Zu 10 ml sedimentiertem Träger werden 400 mg N-(Chlorcarbonyloxy)-5-norbornen-2,3-dicarboximid (CICOONB) in 10 ml wasserfreiem Aceton p.a. gegeben. Unter Schütteln wird innerhalb von 15 Minuten eine Lösung von 280 μl Triethylamin und 20 mg 4-Dimethylamino-pyridin (DMAP) in 5 ml trockenem Aceton tropfenweise zugegeben (Molverhältnis CICOONB : Triethylamin : DMAP 1:1,2:0,1). Man schüttelt anschließend weitere 15 Minuten und wäscht dann den Träger mit ca. 200 ml wasserfreiem Aceton.

b) Kopplung der IgY an einen festen Träger

Die nach Beispiel 4a) aktivierte Polysaccharid-Matrix (Gel) wird stufenweise in ein wäßriges Medium überführt und dann sofort in die Kopplungslösung, die den Liganden enthält, eingerührt. Als Kopplungspuffer wird Citratpuffer pH 4,2 verwendet. Die Kopplung erfolgt unter leichtem Schütteln 2 h bei Raumtemperatur. Freie Bindungen werden anschließend durch Zugabe von Ethanolamin blockiert. In der Tab. 2 sind die konkreten Bedingungen für die einzelnen Antikörper dargestellt.

Tabelle 2

Gel Nr.	Chicken-Ak (IgY)	mg	mg/ml	Ak-Lösung (ml)	ml Kopplungspuffer (Citrat, 0,1 M, pH 4,2)	Ethanolamin 1 M (ml)	feuchtes Gel (g)
1	ChalL1	9,5	13,5	0,7	4,3	0,5	5,55
2	ChalL6	9,8	9,8	1,0	4,0	0,5	5,58
3	ChalL10	9,2	7,4	1,2	3,8	0,5	5,55
4	ChaTNF	11,0	11,6	1,0	4,1	0,5	5,56
5	ChaLPS	11,6	13,7	0,9	4,2	0,5	5,60
6	ChaC3a	6,9	10,7	0,6	4,4	0,5	5,57
7	ChaC5a	11,3	11,1	1,0	4,0	0,5	5,55
8	Kontrolle	0,0	0,0	0,0	5,0	0,5	5,61

Beispiel 5

Die nach Beispiel 4 immobilisierten Antikörper werden benutzt, um aus flüssigen Medien wie Pufferlösungen, Serum oder Blutplasma Lipopolysaccharide, Interleukine, TNF oder Komplementfaktoren zu entfernen.

Dazu werden die Träger gewaschen, in einen physiologischen Puffer (PBS) überführt und luftblasenfrei in Plastik- oder Glassäulen gepackt. Die Anordnung wird durch Anschluß an eine Chromatografieeinrichtung komplettiert. Das zu adsorbierende Probenmaterial (mit den Antigenen dotierter Puffer, Serum- oder Blutplasma-proben, dotiert oder mit natürlichem Antigengehalt) kann nun durch Schwerkraft oder mit einer geeigneten Pumpe über die immobilisierten, für die aufgeführten Antigene spezifischen Antikörper geleitet werden. Die vorhandenen Antigene werden von den IgY erkannt, fest gebunden und somit aus dem die Säule durchströmenden Medium entfernt. Der Nachweis der Wirksamkeit erfolgt durch Analyse (ELISA) des Säulendurchlaufs, dessen Antigengehalt vermindert ist. Nach Waschen der Säule mit physiologischem Puffer erfolgt die Desorption des gebundenen Antigens mit geeigneten Elutionsmitteln (0,1 M Citratpuffer pH 3), Fraktionierung und Analyse des Eluates. Der quantitative Nachweis der Antigene wird zur Kapazitätsbestimmung des Immunosorbents genutzt.

Patentansprüche

1. Immunadsorber zur Sepsistherapie gekennzeichnet durch Trägermaterialien aus organischen oder synthetischen Polymeren mit gebundenen poly- oder monoklonalen Antikörpern, die gegen die Komplementfaktoren C3a und/oder C5a und gegen Lipopolysaccharide (LPS) sowie ggf. mit Antikörpern, die gegen weitere Sepsis-Mediatoren gerichtet sind.
2. Immunadsorber nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper polyklonale Antikörper sind.
3. Immunadsorber nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper aviäre Antikörper des Typs IgY sind.
4. Immunadsorber nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß weitere Antikörper gegen Sepsis-Mediatoren entsprechend des Zustandes der Dysregulation enthalten sind.
5. Immunadsorber nach Anspruch 1 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß diese Antikörper gegen TNF, IL1, IL6, IL8 und/oder IL10 gerichtet sind.
6. Immunadsorber nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die gebundenen Antikörper gegen mindestens eine der folgenden Peptidsequenzen der Komplementfaktoren C3a und C5a

C3a: NH₂-KCCEDGMRQNPMR-COOH
 NH₂-RFSCQRRTRFISL-COOH
 NH₂-ITELRRQHARAS-COOH

C5a: NH₂-QADYKDDDDKLPAE-COOH
 NH₂-DDKLPAEGLDIENS-COOH

gerichtet sind.

7. Immunadsorber nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die gebundenen Antikörper gegen mindestens eine der folgenden Peptidsequenzen der Interleukine 1 α und 1 β

IL1 α : NH₂-NCYSENEEDSSSID-COOH
NH₂-GAYKSSKDDAKIT-COOH
NH₂-WETHGTKNYFTS-COOH
IL1 β : NH₂-RISDHHYSKGFRQA-COOH
NH₂-VQGEESNDKIPVA-COOH
NH₂-ESVDPKNYPKKKMEKRF-COOH

gerichtet sind.

8. Immunadsorber nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die gebundenen Antikörper gegen mindestens eine der folgenden Peptidsequenzen des Interleukin 6

IL6: NH₂-APHRQPLTSSERIDKQI- COOH
NH₂-QNRFESSEEQARA- COOH
NH₂-AITTPDPTTNAS- COOH

gerichtet sind.

9. Immunadsorber nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die gebundenen Antikörper gegen mindestens eine der folgenden Peptidsequenzen des Interleukin 10

IL10: NH₂-SPGQGTQSENSCT-COOH
NH₂-QMKDQLDNLLLKES-CCOH
NH₂-MPQAENQDPDIKA-COOH
NH₂-LPCENKSKAVEQ-COOH

gerichtet sind.

10. Immunadsorber nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die gebundenen Antikörper gegen mindestens eine der folgenden Peptidsequenzen

TNF α : NH₂-VRSSSRTPSDKPVA-COOH
NH₂-KSPCQRETPEGAEAKPW-COOH

gerichtet sind.

11. Immunadsorber nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß das organische oder synthetische Trägermaterial aus Membranen oder Parti-

keln aus Polystyrolen, Kohlenhydraten, wie Zellulose- oder Agarosederivaten, oder Acrylaten besteht.

12. Immunadsorber nach den Ansprüchen 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die spezifischen Antikörper kovalent an die Membranen oder Partikel gebunden sind.
13. Immunadsorber nach den Ansprüchen 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper über Spacer oder Linker an die Trägermaterialien fixiert sind.
14. Verfahren zur Herstellung von Immunadsorbern gemäß Anspruch 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß an Trägermaterialien aus organischen oder synthetischen Polymeren Antikörper, die gegen C3a und/oder C5a und LPS sowie ggf. gegen weitere Sepsis-Mediatoren gerichtet sind, kovalent oder adsorptiv gekoppelt werden.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper durch Immunisierung vorzugsweise von Kleinsäugern, wie Mäusen, Ratten oder Kaninchen, oder Vögeln, wie Hühnern, mit den entsprechenden Antigenen hergestellt werden.
16. Verwendung von Immunadsorbern gemäß Anspruch 1 bis 13 als wirksamer Bestandteil einer Vorrichtung zur Entfernung von Komplementfaktoren, LPS und ggf. weiteren Mediatoren in patientenspezifischer Kombination aus Körperflüssigkeiten.
17. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Immunadsorber für die Plasmapherese bei Patienten mit Sepsis oder septischem Schock sowie anderen Krankheiten, die mit Entzündungen einhergehen, eingesetzt werden.